

Desarrollo de un modelo *in vitro* para identificar inhibidores de ADN-girasa de *Mycobacterium tuberculosis*

Verónica López Llorente^{1,2*}, Cleofé Zapatero González²

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** Departamento Molecular Discovery Research, GlaxoSmithKline I+D S.L., Tres Cantos, Madrid, España

Resumen

Según la OMS, la tuberculosis causa más de 1.4 millones de muertes al año. La resistencia a los medicamentos antituberculosos constituye un problema de salud pública de primera magnitud, que amenaza el éxito de la estrategia recomendada por la OMS para detectar y curar la tuberculosis, y pone en peligro la lucha contra la enfermedad a escala mundial. La búsqueda de nuevos antibióticos para superar la creciente propagación de la tuberculosis multi-resistente (MDR-TB), se puede abordar desde dos direcciones: la identificación y validación de nuevas dianas ó la exploración de nuevas series químicas ó modificación de las actuales clases de fármacos, para eliminar las posibles resistencias cruzadas. El desarrollo de modelos *in vitro* que nos permitan la identificación y caracterización de inhibidores de ADN-girasa en micobacterias, resulta especialmente interesante en el marco de una terapia antimicrobiana, con especial interés para aquellos compuestos cuyo sitio de unión a la ADN-girasa sea diferente al correspondiente a la moxifloxacina (Fase III en ensayos clínicos) por lo que cabría esperar actividad frente a resistentes a fluoroquinolonas. En este trabajo vamos a abordar la puesta a punto y validación de un ensayo para ADN-girasa de *Mycobacterium tuberculosis*. El uso de este modelo *in vitro* permite la identificación de nuevos inhibidores de la ADN-girasa de *Mycobacterium tuberculosis*. Se propone probar un set de 177 compuestos de GSK, construido a partir de los resultados de una campaña de detección fenotípica frente a *Mycobacterium bovis* BCG y confirmados posteriormente con éxito en *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Estos compuestos fueron identificados y puestos a disposición de la comunidad científica para maximizar el impacto potencial de los mismos como herramientas para validación de dianas, mientras que al mismo tiempo proporciona posibles puntos de partida para nuevas rutas de síntesis para la generación de cabezas de serie.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*; ADN-girasa; Inhibidor; electroforesis; sonda

Cita: López V, Zapatero C (2014) Application of non-homogeneous label free assay formats for drug discovery". *Dianas* 3(1): e20140906. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20140906 URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 11 de abril de 2014

Copyright: © 2014 Verónica López Llorente et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es_ES

***E-mail:** veronica.lopez.llorente@gmail.com



Introducción

La tuberculosis (TB) es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) y provoca la muerte de 1,4 millones de personas cada año. Es una enfermedad que principalmente afecta a los pulmones y se transmite de persona a persona por el aire a través de esputo, tos o estornudo. Se estima que alrededor de un tercio de la población mundial está infectada por *Mtb*. [1]

La pared celular de *Mtb* es más gruesa que la de muchas otras bacterias, tiene una capa de cera rica en ácidos micólicos, que permiten que el bacilo permanezca en estado latente durante varios años. El sistema inmunológico del cuerpo puede contener la enfermedad, pero no destruirla. Aunque algunas personas con esta infección latente nunca desarrollarán la TB activa, alrededor del 5 al 10 por ciento enfermará en su vida. [2]

Las personas que están co-infectadas con VIH y TB, tienen una probabilidad de 21 a 34 veces más de padecer tuberculosis, ya que una acelera el progreso de la otra. El riesgo de tuberculosis es también mayor en personas que tienen comprometido su sistema inmune por otras causas, como malnutrición, diabetes o fumadores, los cuales tienen un riesgo mucho mayor de caer enfermos.

Más del 95% de los casos y muertes por esta enfermedad se dan en países en vías de desarrollo. Sin el tratamiento adecuado hasta dos tercios de las personas enfermas de tuberculosis morirán. Los medicamentos antituberculosos actuales inhiben procesos celulares. Estos agentes se pueden clasificar en:

Inhibidores de la síntesis de proteínas, inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos e inhibidores de la producción de energía. [3]

Son tratamientos largos y difíciles de administrar, además varían dependiendo de la gravedad de la enfermedad, existen distintos tratamientos posibles, en función del tipo de tuberculosis (Tabla 1) [4]

Tipo	Descripción	Tratamiento	Problemas
SAT	Tb sensible a tratamientos de primera línea	Duración 6 meses Cuatro antimicrobianos: Isoniazida, rifampicina, estreptomicina y pirazinamida.	Adherencia Resistencias
MDR-TB	Resistencia a isoniazida y rifampicina,	Combinación de 8-10 medicamentos en terapias con una duración de 18-24 meses	Prolongado, costoso y tóxico
XDR-TB	Resistente a todas las fluoroquinolonas y al menos a uno de los tres medicamentos inyectables de segunda línea (capreomicina, kanamicina y amikacina),	Opciones para el tratamiento muy limitadas y difíciles de adquirir en entornos con pocos recursos.	Efectos secundarios graves, como nefrotoxicidad y ototoxicidad.
LTBI	Asintomática y no infecciosa, el sistema inmune restringe el crecimiento de <i>Mtb</i>	9 meses de tratamiento preventivo con isoniazida.	Adherencia Toxicidad

Tabla 1. Tratamientos antituberculosos. SAT (Sensitive Active Tuberculosis), MDR-TB (Multi-drug-resistant tuberculosis), XDR-TB (Extensively-drug-resistant tuberculosis), LTBI (Latent tuberculosis infection).

La situación actual necesita de forma inmediata la identificación de nuevos fármacos que puedan solventar los problemas de los tratamientos actuales y ser eficaces y seguros. Esta búsqueda puede estar enfocada hacia dos direcciones: identificación y validación de nuevas dianas y exploración de nuevas series químicas o modificación de los fármacos existentes.

ADN-girasa como diana farmacológica

La ADN-girasa es una topoisomerasa de tipo II, que se encuentra en todas las bacterias, pero no está presente en humanos ni animales y representa un papel importante en la replicación del ADN. Esto hace que sea una buena diana para la quimioterapia antibacteriana.

ADN-girasa se encarga de generar superenrollamiento negativo durante el proceso de transcripción en el cromosoma bacteriano provocando su condensación para la división celular. Es un tetrámero formado por dos subunidades A, donde se encuentra el dominio de unión al ADN y dos subunidades B con actividad ATPasa, que cataliza reacciones en las que de forma transitoria se rompen dos hebras de ADN, mediante un proceso dependiente de la hidrólisis de ATP (Figura 1).

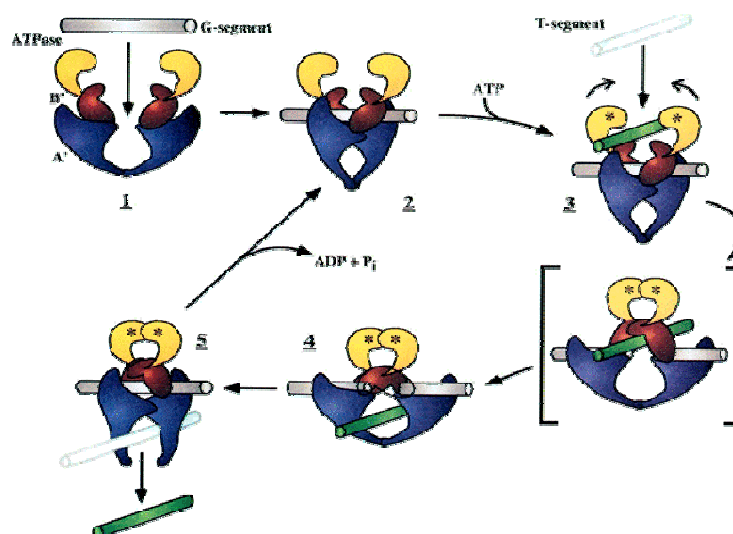


Figura 1. Mecanismo de acción ADN-girasa [6].

El mecanismo [5] comienza con la unión de un fragmento de ADN (Segmento G) a la subunidad A. A continuación dos moléculas de ATP se unen al sitio activo de la subunidad B, lo que provoca un cambio conformacional que permite la entrada de un segundo fragmento de ADN (Segmento T). Después se produce la escisión del segmento G, que se une a la enzima mediante un enlace covalente. A continuación, el segmento T pasa a través de la escisión generada dando lugar al superenrollamiento. Por último la enzima vuelve a unir ambos extremos que se generaron tras la escisión del segmento G para la posterior liberación de los fragmentos G y T.

La mayoría de los fármacos que tienen como diana la ADN-girasa, como las quinolonas entre las que se incluyen las fluoroquinolonas, inhiben la actividad de la ADN-girasa estabilizando el complejo que se forma entre la enzima y el ADN al producirse la escisión o bloquean el sitio activo donde se une el ATP. Los inhibidores de la ADN-girasa que tengan un mecanismo de acción diferente al de los medicamentos ya existentes, serían eficaces tanto en tuberculosis sensible como en tuberculosis resistente a fármacos.

Mutaciones en la ADN-girasa se han asociado con resistencias a antibióticos [7], estas mutaciones producen: disminución de la permeabilidad de la pared celular a los medicamentos, secuestro de los fármacos e inactivación del principio activo de los medicamentos. De ahí, la importancia de encontrar y caracterizar nuevos inhibidores de *Mtb* para asegurar el éxito de los tratamientos futuros.

Hipótesis y objetivos

Pretendemos desarrollar un modelo *in vitro* para detectar inhibidores de ADN-girasa de *Mtb* para una fácil identificación y caracterización de nuevos fármacos antituberculosos. Los principales objetivos son la puesta a punto del kit comercial “*Mycobacterium tuberculosis* Gyrase Supercoiling Assay” y validación con inhibidores conocidos, así como la identificación de inhibidores selectivos de ADN-girasa de *Mtb* procedentes de un set de 177 compuestos de GSK, construido a partir de los resultados de una campaña de detección fenotípica frente a *M.bovis* BCG y confirmados posteriormente con éxito en *M.tuberculosis* H37Rv.

Materiales y métodos

Para llevar a cabo los ensayos de superenrollamiento utilizamos el kit comercial “*Mycobacterium tuberculosis* Gyrase Supercoiling Assay kit” de Inspiralis (MTS001 y MTS002). Este kit contiene ADN-girasa de *Mtb*, tampón de ensayo (5X) y tampón de dilución. El sustrato que añadimos al kit anterior para que se de la reacción, es el plásmido relajado pBR322 (R5003) de Inspiralis de 4361 pares de bases. La reacción consiste en 1 U de girasa que superenrollará 0.5 µg de ADN relajado pBR322, en un volumen de reacción de 30 µl a 37° C durante 1 h en el tampón de ensayo.

Superenrollamiento de ADN

La capacidad de superenrollamiento de la ADN-girasa de *Mtb*, se mide usando geles al 1% (w/v) de agarosa (100 ml de TAE para 1g de agarosa LE) sin bromuro de etidio. En nuestro caso, 20 µl de la reacción con ADN-girasa de *Mtb* se mezclan con 5 µl de solución de parada [50% (v/v) glicerol que contiene 0.25% (v/v) azul de bromofenol]. En el gel de agarosa al 1% preparado previamente, se corren las muestras usando un equipo de electroforesis (Power Pharmacia LKB-GPS 200/400) a 20V durante 16h. Posteriormente, se tiñe con una sonda durante 30 minutos. A continuación, se procede a la lectura y análisis del gel utilizando el equipo ChemiDoc™ MP System de BioRad que es un equipo específicamente diseñado para la documentación y análisis de la imagen de patrones de bandas. Las condiciones usadas para capturar la imagen son: epi long wave UV, 1.38 MPixel (1x1 bin) con el filtro de EtBr/uv.

En los resultados discutiremos acerca de la puesta a punto del ensayo: selección de la cantidad de enzima y plásmido, optimización del volumen de ensayo, la potencia y selección de la mejor sonda para el revelado.

Ensayo con set de compuestos GSK

Esta plataforma se pone a punto midiendo la capacidad inhibitoria sobre la ADN-girasa de *Mtb* de un set de 177 compuestos de GSK (TB set) que se han identificado como inhibidores de H37Rv y no son citotóxicos. [8]

Análisis de los datos.

Los datos obtenidos se analizan estadísticamente mediante los programas Microsoft Excel, Grafit e Image Lab. Dichos datos se normalizan con respecto a los controles de máxima y mínima actividad incluidos en dicho experimento. (Ecuaciones 1 y 2) [9]

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - 100 * \left[\frac{\text{dato} - \text{control 2}}{\text{control 1} - \text{control 2}} \right]$$

Ecuación 1. Ecuación del porcentaje de inhibición. **Control 1:** Máxima actividad de enzima. **Control 2:** Ausencia de enzima.

$$y = \frac{\text{Range}}{1 + \left(\frac{x}{\text{IC}_{50}} \right)^s} + \text{Background}$$

Ecuación 2. Ecuación de IC_{50} en base a la ecuación de cuatro parámetros.

Resultados

Puesta a punto y validación del kit comercial “*Mycobacterium tuberculosis* Gyrase Supercoiling Assay”

Selección de cantidad de enzima y plásmido

Para ello optimizamos en primer lugar la cantidad de enzima manteniendo constante la cantidad de plásmido a 0.5 µg, realizamos una dilución seriada de la enzima (empezando en 2 U/ml, ocho puntos y dilución 1/2). En los resultados podemos ver que las bandas 5 y 6 (Figura 2) se asemejan bastante al control 1 (actividad enzimática máxima), de manera que 0.1 U/µL de enzima son suficientes para que la reacción se complete correctamente, lo que significa el tres veces superior a la recomendada por el proveedor.

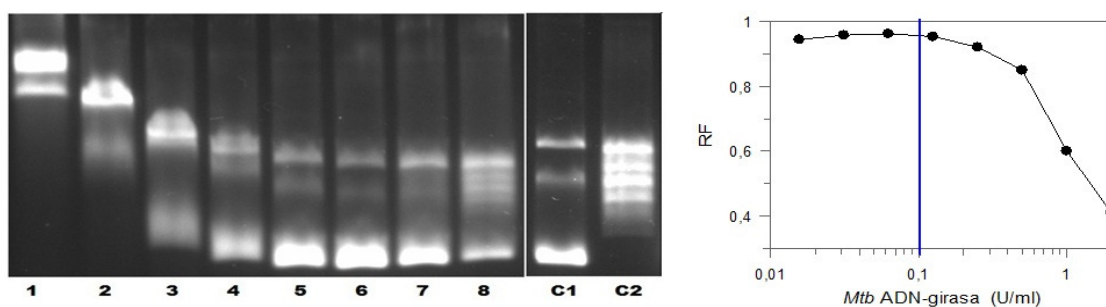


Fig 2. Dosis de enzima.

Después optimizamos la cantidad de plásmido, manteniendo constante la cantidad de enzima a 0.1 U/µL, hacemos una dosis del plásmido relajado pBR322 (desde 0.08 µg/µL, siete puntos y dilución 1/2). De la misma forma se observa que las bandas 2 y 3 (Figura 3) son similares al Control 1, por lo que concluimos que 0.03 µg/µL de plásmido relajado serán suficientes para que se produzca la reacción, lo que significa el 2 veces más que la recomendación del proveedor del kit comercial.

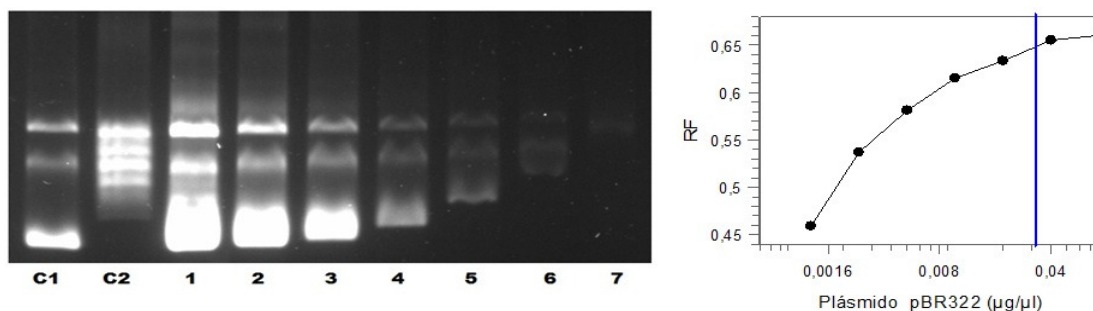


Fig 3. Dosis de plásmido

Optimización de volumen de reacción

Para que se complete la reacción de ADN-girasa de *Mtb* de forma satisfactoria, debemos tener en cuenta la proporción que existe entre los distintos componentes de la solución enzima y de la solución sustrato, ya que algunos de estos componentes presentes en los tampones de ensayo, como el catión Mg^{2+} o el DTT, pueden ser necesarios para el transcurso de la reacción.

Para resolver esta cuestión se realizan tres ensayos con distintas condiciones de adición. Mantenemos constantes las concentraciones de solución enzima 0.1 U/ µL y solución sustrato 0.03 µg/ µL en el volumen final de reacción. En el primero de los ensayos, se adicionan 10 µL de solución enzima más 10

μL de solución sustrato, en el segundo caso se adicionan 2.5 μL de solución enzima más 22.5 μL de solución sustrato y en el tercer caso 2.5 μL de solución enzima más 17.5 μL de solución sustrato.

De los resultados obtenidos se concluye que la reacción transcurre mejor utilizando 2.5 μL de solución enzima más 17.5 μL de solución sustrato. Las mismas proporciones recomendadas por el proveedor pero con una reducción del 30% del volumen de ensayo.

Puesta a punto de la electroforesis en gel de agarosa

Para la obtención de unas bandas bien definidas hemos de tener en cuenta tanto la potencia electroforética como las sondas fluorescentes para cuantificación de ADN que se usan en la electroforesis de geles de agarosa.

Potencia usada en la electroforesis de geles de ADN.

Para seleccionar la potencia a la que se lleva a cabo la electroforesis de geles de ADN, se hacen cuatro ensayos con las condiciones de reacción descritas anteriormente, utilizando distintas potencias: 100, 75, 50 y 25V. De esta manera vemos que las bandas mejor definidas son las que obtenemos tras una electroforesis a 25V durante 12h, lo que nos facilita el posterior análisis de la imagen de patrones de banda.

Optimización del sistema de revelado

El bromuro de etidio (EtBr) es el marcador usado habitualmente en los laboratorios de biología molecular pero al tratarse de una sustancia con efecto mutágeno y teratógeno, debido a que es un intercalador de ADN, decidimos probar 6 marcadores comerciales con el objetivo de trabajar con uno más seguro. (Tabla 2).

Sonda	Mutagenicidad/Contaminante	Sensibilidad	λ EXCITACIÓN	λ EMISIÓN
Bromuro de Etidio	SI/SI	1ng	300/520 nm	600 nm
SYBR® Safe	Reducida/NO	3ng	280/502nm	546 nm
SYBR® Gold	Reducida/NO	>25 pg)	300/495nm	537nm
SYBR® Green I	Reducida/NO	>60 pg	290/380nm	520nm
GelGreen)	NO/NO	-----	500nm	540nm
GelRed	NO/NO	-----	280nm	590nm
Diamond™	NO/NO	Mayor que EtBR	494nm	558nm

Tabla 2. Tabla comparativa de las diferentes sondas testadas para el revelado de los geles de agarosa [10].

Se realizan seis geles en las mismas condiciones de reacción expuestos en la sección de materiales y métodos. Estos se van a revelar con cada una de las distintas sondas, 40 μL de sonda (stock $10^4\times$) en 400 mL de tampón TAE, durante 30 minutos. Según los resultados podemos apreciar que la sonda que mejor imagen nos proporciona del patrón de bandas es SYBR® Safe. (Figura 4B).

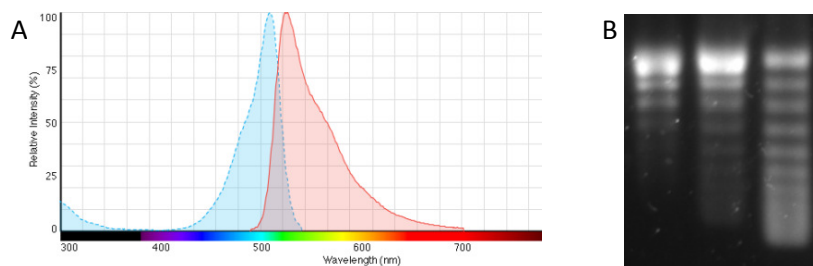


Figura 4. (A): Espectro de emisión/excitación de SYBR® Safe DNA Gel Stain [12]. (B): Imagen de gel de agarosa tinción con SYBR® Safe DNA Gel Stain y lectura con protocolo Alexa 546.

Se aplica el protocolo de lectura propio de cada sonda y adicionalmente se utiliza otro protocolo de lectura para todas ellas: Alexa 546. (Figura 4A).

El protocolo de lectura de SYBR Safe excita a 300 nm, a esta longitud de onda la sonda tiene un pico de excitación, pero menor que el que presenta a 502 nm. Por este motivo, el protocolo de lectura Alexa 546

nos proporciona una imagen más clara del patrón de bandas, ya que excita a $\lambda = 502 \text{ nm}$, y emite a $\lambda = 546 \text{ nm}$.



Figura 5. Validación del ensayo

Validación del ensayo

A continuación, se procede a la validación del ensayo con un inhibidor conocido de la ADN-girasa, Novobiocina, que es un inhibidor competitivo de la actividad ATPasa catalizada por la subunidad GyrB [14]. El compuesto se ensayan utilizando una dilución seriada en DMSO (10 puntos, con un factor de dilución 1/3) comenzando en 100 μM , con 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de plásmido relajado pBR322 y 0.1U/ μL de ADN-girasa de *Mtb* en un volumen total de reacción de 20 μL . Se incluyen control 1 (máxima actividad enzimática) y control 2 (ausencia de enzima). Después se incuba la reacción a 37° C, y se aplican las muestras en un gel de agarosa. A continuación se revela el gel con una sonda durante 30 minutos, y se cuantifican las bandas utilizando el programa Image Lab. Por último, se normalizan los datos obtenidos con respecto a control 1 y control 2, utilizando la ecuación de la figura 2, para cuantificar el grado de superenrollamiento en presencia de distintas concentraciones de inhibidor. Una vez que tenemos los datos normalizados, aplicamos la ecuación de la ecuación 2 para obtener el valor de IC_{50} de la novobiocina. (Figura 6).

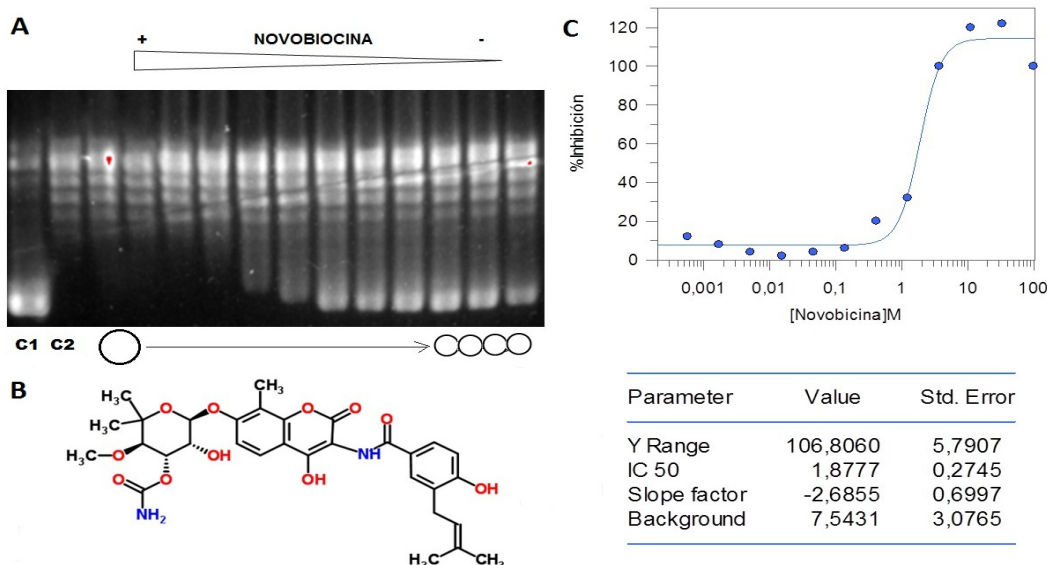


Figura 6. (A) Bioimagen de gel de agarosa. C1 (control 1, máxima actividad enzimática). C2 (control 2: ausencia de actividad enzimática) y una dilución seriada de Novobiocina. (B) Estructura Novobiocina [15] (C) Cálculo de la IC_{50} de la Novobiocina basado en la cuantificación del gel.

Puesta a punto de la plataforma para la identificación de inhibidores de ADN-girasa de *Mtb* usando el TB set.

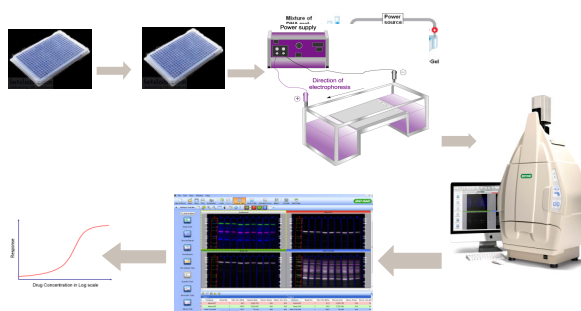


Figura 7. Plataforma.

Para poder medir la actividad de ADN-girasa de *Mtb* en un número elevado de compuestos hemos desarrollado una plataforma semiautomática para medir superenrollamiento del ADN usando pipeteadores (Multidrop-Combi y pipetas multicanal de 16 canales), así como uso de código de barras en las placas de multipocillo 384 y en los geles de agarosa para mantener la integridad de datos, además de un procesamiento de datos automatizado. (Figura 7)

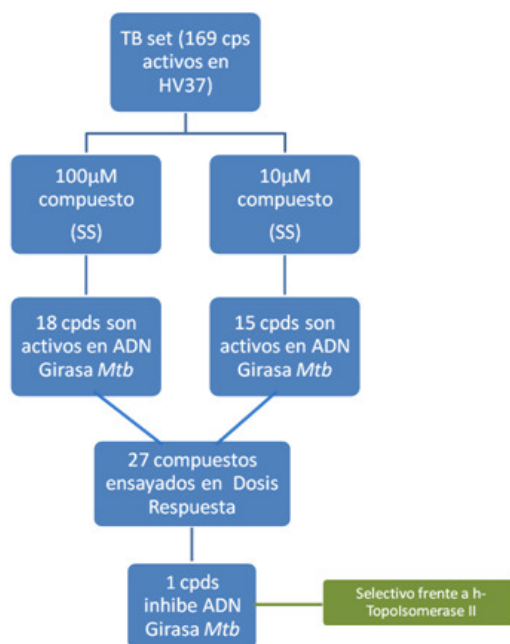


Figura 8. Esquema ensayo TB set

Los compuestos se ensayan en experimentos independientes a 100 μM y 10 μM . En primer lugar se adicionan 2.5 μL de solución enzima (0.1 U/ μL ADN-girasa de *Mtb*) a cada pocillo que contiene 200 nL de una preparación 10 mM en DMSO de los compuestos GSK. A continuación se añaden 17.5 μL de solución sustrato (0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ pBR322). Se incuba durante 1 h a 37°C y finalmente se para la reacción con 5 μL de azul de bromofenol para posteriormente aplicar las muestras al gel. Se lleva a cabo la electroforesis a 25 V durante 12 h y se tiñe con SYBR® Safe durante 30 minutos. La lectura se realiza en ChemiDoc™ MP System con el protocolo Alexa 546 y se analiza el patrón de bandas obtenido con el programa Image Lab. En los resultados obtuvimos un total de 27 compuestos (a 100 μM y/o a 10 μM) que inhibieron el ensayo.

A continuación, para confirmar los 27 compuestos identificados en los experimentos previos (Figura 8), se realiza un ensayo para determinar la dosis-respuesta de cada uno de ellos, en las condiciones de reacción anteriormente descritas. Utilizando diluciones seriadas de cada compuesto en DMSO (empezando en 500 μM , 11 puntos con un factor de dilución de 1/2), y con las condiciones de reacción anteriormente descritas. Después de procesar los geles, obtuvimos como resultado que solo uno de nuestros posibles candidatos inhibe de forma dosis dependiente a la ADN-girasa de *Mtb* (Figura 9).

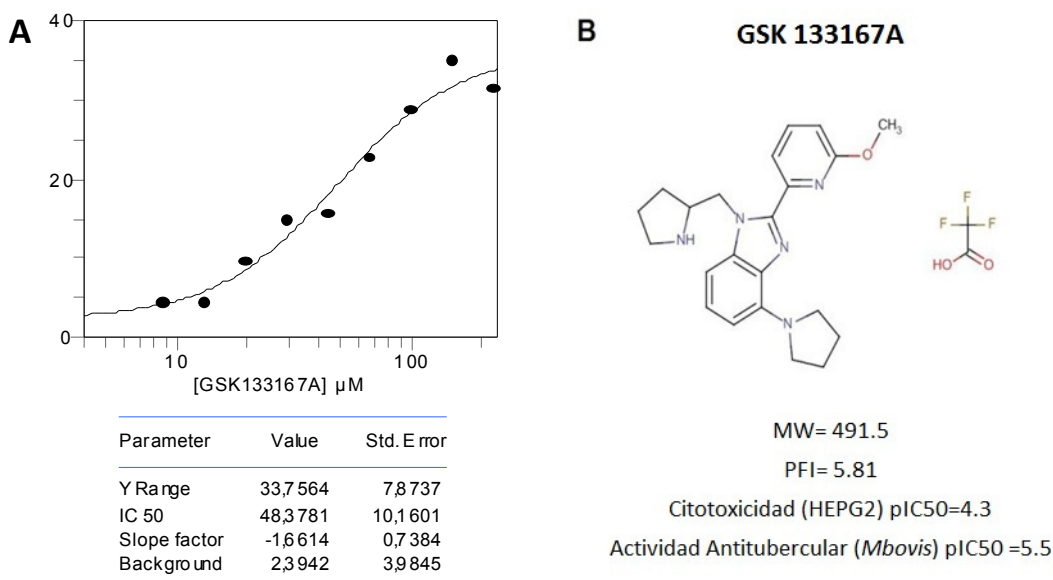


Figura 9.(A) Dosis de compuesto GSK inhibidor de la enzima.(B) Características del compuesto GSK 133167A

Conclusiones

Debido a las tasas de mortalidad de la tuberculosis y a la aparición de nuevas resistencias a fármacos, se hace necesario el descubrimiento de nuevos medicamentos para el tratamiento de esta enfermedad. El reto en el desarrollo de fármacos contra la tuberculosis es conseguir acortar y simplificar los tratamientos y lograr que éstos sean altamente eficaces. Por tanto, enfocando de otra manera la búsqueda de estos fármacos, es posible pensar que inhibidores de la ADN-girasa de *Mtb* con un mecanismo de acción diferente a los tratamientos ya existentes, podrían ser eficaces tanto frente a tuberculosis sensible como a tuberculosis resistente a medicamentos.

En este trabajo, hemos puesto a punto un ensayo que nos permite identificar inhibidores de ADN-girasa de *Mtb*. Hemos puesto a punto un kit comercial que mide el superenrollamiento provocado por esta enzima para ello hemos determinado las condiciones de reacción, la potencia y el tipo de sonda óptimas para el correcto desarrollo del experimento, posteriormente lo hemos validado con un inhibidor conocido.

Hemos desarrollado una plataforma semiautomática para medir superenrollamiento del ADN usando pipeteadores, así como uso de código de barras que nos permiten mantener una mejor integridad de datos, además de un procesamiento de datos automatizado. Esta plataforma nos permite incrementar significativamente el número de compuestos a ensayar con los geles de Agarosa, tanto para este ensayo como para cualquier otro.

Esta plataforma se ha puesto a punto con un set identificado de compuestos de GSK denominado TB set (177 compuestos con actividad antitubercular), que previamente se han separado en un screening fenotípico. Hemos detectado un inhibidor de ADN-girasa de *Mtb* (GSK133167A), de manera que gracias a este ensayo se puede establecer una estrategia para priorizar compuestos, basándonos en su potencia inhibitoria y en su mecanismo de acción. Experimentos con cepas mutadas serán necesarios para confirmar que el mecanismo de acción propuesto es correcto.

Como trabajo futuro, se pretende ensayar un set formado por un mayor número de compuestos denominado TB-box (11124 compuestos con actividad antitubercular), y de los que resulten positivos, medir la capacidad inhibitoria sobre la topoisomerasa II humana, para determinar si son selectivos o no contra *Mtb*. Estos compuestos podrían servir como punto de partida para desarrollar futuros fármacos para el tratamiento de la tuberculosis.

Agradecimientos

Agradecer a todos los compañeros de GSK su ayuda, amabilidad y colaboración, y en especial a mi tutora Cleofé Zapatero y a María Jesús Vázquez por todo su apoyo y empeño empleado en enseñarme durante estos meses. También quiero dar las gracias a mi familia por su paciencia y por haberme dado la oportunidad de tener esta formación.

Referencias

1. Global tuberculosis report. **2013**. In WHO, World Health Organization.
http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. The TB pandemic. **2014**. In Global Alliance for TB Drug Development.
<http://www.tballiance.org/why/the-tb-pandemic.php>
3. Huang Y. Y., Deng J. Y., et al. **2006**. The key DNA-binding residues in the C-terminal domain of Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase A subunit (GyrA). *Nucleic Acids Res.* 34 (19): 5650-9.
4. Wai Yew, W., Cynamon, M. and Zhang, Y. **2011**. Emerging drugs for the treatment of tuberculosis. *Review Expert Opinion. Emerging Drugs.* 16 (1): 1-21.
5. Mdluli K., Ma Z. **2007**. Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase as a target for drug discovery. *Infect. Disord. Drug Targets.* 7 (2): 159-68.
6. James C. Wang. **2009**. DNA entanglement and the action of the DNA Topoisomerases, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.* 245.
7. Ginsburg, A. S., Grosset, J. H. and Bishai, W. R. **2003**. Fluoroquinolones, tuberculosis and resistance. *The Lancet infectious Diseases.* 3: 432-42.
8. Ballell, L., et al. **2013**. Fueling Open- Source Drug Discovery: 177 Small-Molecule Leads against Tuberculosis. *Chem. Med. Chem.* 8: 313-21.
9. Zhang, J. H., Chung T. D. & Oldenburg K. R. **1999**. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Biomol Screen.J.* 4: 67-73.
10. Aubry, A. et al. **2004**. Mycobacterium tuberculosis DNA Gyrase: Interaction with Quinolones and Correlation with antimycobacterial drug activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 48(4): 1281-88.
11. Pravin S., Shahul H. **2012**. Nonfluoroquinolone-Based Inhibitors of Mycobacterial Type II Topoisomerase as Potential Therapeutic Agents for TB. *Annual Reports in Medicinal Chemistry.* 47: 319-28.
12. The Alexa Fluor Dye Series-Note 1.1. **2014**. In Life Technologies.
<http://www.lifetechnologies.com/es/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/technical-notes-and-product-highlights/the-alex-a-fluor-dye-series.html>
13. SYBR® Safe DNA Gel Stain.2014. In Life Technologies.
<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/S33102>
14. DNA Stains. **2014**. In Life Technologies. <http://www.lifetechnologies.com/es/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-stains.html>
15. Novobiocin. **2014**. In Pubchem.
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=23710502>